

UNIVERSITÉ DE PARIS. -- FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1927-1928

N° 17

Sur la nutrition du Mycélium de quelques Champignons Hyménomycètes

THÈSE

pour l'obtention du Diplôme de

Docteur de l'Université de Paris (Pharmacie)

Présentée et soutenue le

1928

PAR

Madeleine LESIEUR

PHARMACIEN

JURY :

MM. RADAIS, *Président.*

LUTZ, *Chargé de Cours.*

MASCRÉ, *Agrégé.*

SAINT-DIZIER
ETABLISSEMENTS ANDRÉ BRULLIARD

1928



Digitized by the Internet Archive
in 2026

THÈSE
POUR LE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS (PHARMACIE)

UNIVERSITÉ DE PARIS. -- FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1927-1928

N° 17

Sur la nutrition du Mycélium de quelques Champignons Hyménomycètes

THÈSE

pour l'obtention du Diplôme de

Docteur de l'Université de Paris (Pharmacie)

Présentée et soutenue le

1928

PAR

Madeleine LESIEUR

PHARMACIEN

JURY :

MM. RADAIS, *Président.*

LUTZ, *Chargé de Cours.*

MASCRÉ, *Agrégé.*

SAINT-DIZIER
ÉTABLISSEMENTS ANDRÉ BRULLIARD

1928

Personnel de la Faculté de Pharmacie

ADMINISTRATION

MM. RADAIS, *Doyen*, O. *,  I.
 PERROT, *Assesseur*, O. *,  I.
 G. DURSENT, *Secrétaire*, *,  I.

PROFESSEURS

MM. H. GAUTIER, O. *,  I.	Chimie minérale.
RADAIS, O. *,  I.	Cryptogamie et Microbiologie.
BÉHAL, Membre de l'Institut,	
C. *,  I.	Chimie organique.
PERROT, O. *,  I.	Histoire naturelle des Médicaments.
COUTIÈRE, O. *,  I.	Zoologie.
GRIMBERT, *,  I.	Chimie biologique.
LEBEAU, O. *,  I.	Pharmacie chimique.
DELÉPINE, O. *,  I.	Hydrologie et Hygiène.
GUERBET, *,  I.	Toxicologie.
BOUGAULT, *,  I.	Chimie analytique.
GORIS, *,  I.	Pharmacie galénique.
GUÉRIN, *,  I.	Botanique générale.
TASSILLY, *,  I.	Physique.

Doyen honoraire : M. H. GAUTIER, O. *,  I.

Professeurs honoraires : MM. MOUREU, G. O. *,  I. et A. VILLIERS, *,  I.

CHARGÉS DE COURS

MM. DAMIENS, *,  I.	Minéralogie.
MARC HONNORAT, *,  I.	Législation, Déontologie pharmaceutique.
LUTZ, *,  I.	Cryptogamie.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. SOMMELET, *,  I.	MM. LAUNOY, *,  I.	MM. PICON,  I.
DAMIENS, *,  I.	HÉRISSEY, *,  I.	FABRE,  I.
LUTZ, *,  I.	DELABY,  I.	MASGRÉ,  I.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. DEFACQZ, *,  I.	Chimie générale.
COUSIN, *,  I.	Chimie analytique.
SOUÈGES,  I.	Micrographie.
LEROUX,  I.	Physique.
DEVAL,  I.	Microbiologie.

Agrégés chargés des Travaux généraux de 4^e année.

HÉRISSEY, *,  I. DELABY,  I. PICON,  I.

Bibliothécaire en Chef : M. BEAULIEUX,  I.



A MES PARENTS

*En témoignage de ma reconnaissance pour leur abnégation sans borne,
et de ma profonde affection.*

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR M. RADAIS

DOYEN DE LA FACULTÉ.

*Hommage de ma profonde reconnaissance et de mon
attachement respectueux.*

A MONSIEUR L. LUTZ

PROFESSEUR AGRÉGÉ DE CRYPTOLOGIE

Qui m'a inspiré ce travail et guidé de ses conseils.

*En témoignage de ma respectueuse et vive reconnaissance
pour la sympathie et la bienveillante attention
qu'il n'a cessé de me témoigner,*

A MONSIEUR D. BACH

PHARMACIEN DES HÔPITAUX.

Hommage de ma profonde gratitude.

A MON JURY DE THÈSE.

BIBLIOGRAPHIE

1. **Béchamp**, 1858. — De l'influence que l'eau pure ou chargée de différents sels exerce à froid sur le sucre de canne. — *Annales de Chimie et de Physique*, t. LIV, p. 28.
2. **Pasteur**, 1859. — Mémoires sur la fermentation alcoolique. — *Annales de Chimie et de Physique*, t. LVIII, p. 323.
3. **Raulin (J.)**, 1870. — Etudes chimiques sur la végétation. — Thèse de doctorat ès-sciences, Paris.
4. **Mayer**, 1869. — *Untersuchungen über die alkoolische Gahrung*.
5. **Dubrunfaut**, 1871. — Sur la fermentation et le ferment alcooliques. — *C. R. Ac. Sc.*, t. LXXIII, p. 263.
6. **Laurent**, 1889. — Recherches sur la valeur comparée des nitrates et des sels ammoniacaux comme aliment de la levure de bière et de quelques autres plantes. — *Ann. Inst. Pasteur*, t. III, p. 362.
7. **Van Tieghem**, 1876, **Brefeld**, 1877. — D'après Costantin et Matruchot. — Sur la production des mycéliums des Champignons supérieurs. — *C. R. Soc. Biologie* (6^e série), t. III, p. 16.
8. **Costantin**, 1891. — Etude sur la culture des Basidiomycètes. — *Rev. gén. Bot.*, t. III, p. 497.
9. **Costantin** et **Matruchot**, 1893. — Avantages de la nouvelle méthode de culture du Champignon de couche. — *C. R. Soc. Biologie* (9^e série), t. V, p. 961.
- **Id.** Sur un nouveau procédé de culture du Champignon de couche. — *C. R. Ac. Sc.*, t. CXVI, p. 70.
10. **Costantin** et **Matruchot**, 1896. — Sur la production des mycéliums des Champignons supérieurs. — *C. R. Soc. Biologie* (10^e série), t. III, p. 16.
11. **Matruchot**, 1893. — Sur la culture de quelques Champignons Ascomycètes. — *Bull. Soc. myc. Fr.*, t. IX, p. 246.
12. **Viala** et **Pacottet**, 1904. — Sur la culture du Black-rot. — *Revue de viticulture*, t. XXI, p. 117.
13. **Viala** et **Pacottet**, 1904. — Culture et développement de l'Anthracnose. — *Revue de viticulture*, t. XXII, p. 117.
14. **Viala** et **Pacottet**, 1910. — Recherches sur le *Ræsleria* de la Vigne. — *Revue de viticulture*, t. XXXIV, p. 379-466-550.
15. **Viala**, 1928. — Esca. Culture du *Stereum necator*. — *Revue de viticulture*, t. LXVIII, p. 5-85.

16. **Bensaude (M.)**, 1908. — Recherches sur le cycle évolutif et la sexualité chez les Basidiomycètes. — Thèse de doctorat ès-sciences, Paris.
17. **Boyer**, 1919. — Etudes sur la biologie et la culture des Champignons supérieurs. — *Rev. gén. Bot.*, t. XXXI, p. 774.
18. **Marchal (El. et Em.)**, 1923. — De l'homothallisme de quelques Ascomycètes. *Bull. Ac. Roy., de Belgique*, Classe des Sciences (5^e série), t. IX, p. 8.
19. **Sartoris (G. B.)**, 1924. — Studies in the life history and physiology of certain sunts. *Am. Journal of Bot.*, t. XI, p. 617-647.
20. **Vandendries (R.)**, 1923. — Recherche sur le déterminisme sexuel des Basidiomycètes. *Mém. in-4^o Ac. Roy. de Belgique*, Classe des Sciences, (2^e série), t. V, p. 11.
21. **Vandendries (R.)**, 1927. — Les mutations sexuelles L'hétérohomothallisme et la stérilité entre les races géographiques de *Coprinus micaceus*. *Mémoires in-8^o Ac. Roy. de Belgique*, Classe des Sciences, t. IX, fasc. 3, p. 5.
22. **Dow Vawter Baxter**, 1925. — Biology and pathology of the hard-wood heart-rotting Fungi. *Am. Journ. of Bot.*, t. XII, fasc. 8, p. 523.
23. **Beauverie (J.)**, 1900. — Etudes sur le polymorphisme des Champignons. — Influence du milieu. — *Bull. Soc. myc. Fr.*, t. XVI, p. 111.
24. **Lutz (L.)**, 1925. — Sur la culture des Champignons Hyménomycètes en milieux artificiels. *Bull. Soc. myc. Fr.*, t. XLI, p. 310.
25. **Tubœuf** (1903) et **Rumbold (Mlle)** (1908). — D'après Wolpert, 1924. Fungi and H. ion concentration of media. *Ann. Miss. bot. Gard.*, t. XI, p. 44.
26. **Zeller (S. M.)**, 1916. — Studies in the physiology of the Fungi II. *Lenzites sepiaria* Fries. with special reference to enzyme activity. *Ann. Miss. bot. Gard.*, t. III, p. 439.
27. **Meacham**, 1918. — Notes upon the H. ion concentration necessary to inhibit to growth of four wood destroying Fungi. *Science*, n. s., t. XLVIII, fasc. 1, p. 499-500.
28. **Schmitz (H.)**, 1919. — Studies in the physiology of Fungi. The relation of Bacteria to cellulose fermentation induced by Fungi with special reference to the decay of wood. *Ann. Miss. bot. Gard.*, t. VI, p. 93.
29. **Zeller (S.)**, **Schmitz (H.)** et **Duggar (B.)**, 1919. — Growth of wood-destroying Fungi on liquid media. *Ann. Miss. bot. Gard.*, t. VI, p. 137.
30. **Zeller (S.)**, **Schmitz (H.)** et **Duggar (B.)**, 1919. — Studies in the physiology of the Fungi VIII. Growth of wood destroying Fungi in liquid media. *Ann. Miss. bot. Gard.*, t. VI, p. 137-142.
31. **Webb (R.)**, 1919. — Germination of spores of certain Fungi in relation to H.-ion concentration. *Ann. Miss. bot. Gard.*, t. VI, p. 201 et t. VIII, p. 283.

32. **Webb (R.)**, 1921. — Studies in the physiology of the Fungi X. Germination of the spores of certain Fungi in relation to Hydrogene ion concentration. *Ann. Miss. bot. Gard.*, t. VIII, p. 283-342.
33. **Wolpert**, 1924. — Fungi and H-ion concentration of media. *Ann. Miss. bot. Gard.*, t. XI, p. 43.
34. **Boyle**, 1924. — The growth of certain Fungi to their staling products. *Ann. of Bot.*, t. XXXVIII, p. 113.
35. **Weiss (F)**, 1925. — The condition of infection in potato wart. *Am. Journal of Bot.*, t. XII, p. 413-443.
36. **Killian**, 1926. — Caractères morphologiques et culturaux du *Vermicularia Eryngii*. *Bull. soc. myc. Fr.*, t. XLII, p. 51.
37. **Bach (D.)**, 1925. — Contribution à l'étude de la nutrition azotée de l'*Aspergillus repens* de Bary. — Thèse de doctorat ès-sciences, Paris.
38. **Lutz (L.)**, 1899. — Recherches sur la nutrition des végétaux à l'aide de substances azotées de nature organique. — Thèse de doctorat ès-sciences, Paris.
39. **Douris**, 1923. — Une nouvelle notation de l'acidité Ph. *Bull. Sc. pharm.*, t. XXX, p. 543.
40. **Bach (D.)**, 1927. — Dispositif simple pour mesurer et répartir aseptiquement les liquides stériles. *Bull. Sc. pharm.*, t. XXXIV, p. 691.
41. **Lutz (L.)**, 1925. — Sur la spécificité de quelques Hyménomycètes épiphytes vis-à-vis de leur support. — *Bull. Soc. myc. Fr.*, t. XLI, p. 359.
42. **Meillère (G.)** et **De Saint-Rat**, 1922. — Dosage de l'azote total. Dispositif pour recueillir l'ammoniaque. Application au dosage des albumines du lait. *Journ. Pharm. Chimie*, 7^e série, t. XXV, p. 100.
43. **Fleury (P.)** et **Zaharie Sutu**, 1926. — Le phosphore organique. Son dosage. Quelques résultats. — *Journ. Pharm. Chimie*, 8^e série, t. IV, p. 201.
44. **Javillier**, 1922. — Procédé rapide pour doser l'acide phosphorique. *Bull. Soc. chim. Fr.*, t. XXXI, p. 97.
45. **Brenner (W.)**, 1914. — Die Stickstoffnahrung der Schimmelpilze. *Centr. f. Bakt.* 2 Abt., t. XL, p. 455.
-

Sur la nutrition du Mycélium

de quelques

Champignons Hyménomycètes

HISTORIQUE

Les Champignons supérieurs, et les Hyménomycètes en particulier, n'ont été jusqu'ici l'objet que d'un petit nombre d'essais de culture.

La plupart de ces essais furent calqués sur ceux destinés à reproduire les organismes inférieurs, microorganismes, levures et moisissures diverses.

En 1858, **BÉCHAMP** [1], en effet, avait déjà cultivé des moisissures dans de l'eau sucrée additionnée de différents sels, et l'année suivante **PASTEUR** [2] obtenait la culture de la Levure et de différentes Mucédinées dans un milieu exclusivement minéral, additionné d'une substance sucrée. Mais c'est surtout à **RAULIN** [3] qu'on doit les premières notions précises sur la culture des Champignons inférieurs. Il trouvait en effet que « *le milieu artificiel propre* » à un tel développement « *est formé nécessairement* :

- 1° D'un composé ternaire dont le sucre est le type ;
- 2° D'un composé azoté (ordinairement l'ammoniaque) ;
- 3° De sels minéraux divers »,

mais que « *le développement des organismes dans ces milieux est incomparablement plus faible que dans les milieux naturels, sans qu'on puisse actuellement préciser les causes de cette différence* ».

Les expérimentateurs qui suivirent **RAULIN** supposaient tout d'abord que l'assimilation azotée jouait un rôle important dans cette différence.

MAYER [4], le premier, remarque que l'assimilation des sels ammoniacaux est beaucoup plus facile que celle des nitrates.

DUBRUNFAUT [5] admet pourtant l'assimilabilité de ces derniers, en particulier du nitrate de potasse, qui, d'après lui, facilite l'activité vitale de la Levure.

Cependant, malgré les précisions offertes par **LAURENT** [6], qui reprend les travaux de **MAYER** dans des conditions plus précises et trouve que la Levure préfère les sels ammoniacaux aux nitrates, la question reste confuse. Cette confusion incite les chercheurs à en revenir, pour leurs cultures, et en particulier pour celles des Champignons supérieurs, à des milieux naturels ou à leurs dérivés.

En 1876, **VAN TIEGHEM** [7] obtenait la germination des spores des Coprins, que **BREFELD** [7] reproduisait l'année suivante. Ce dernier publie, en 1889 [7] un travail d'ensemble sur les tentatives de culture des Champignons supérieurs. Il obtient l'ébauche de la fructification du *Nyctalis asterophora* que **COSTANTIN** [8] réalise complètement deux ans plus tard, par culture sur pommes de terre imbibées de jus d'Orange, sur carottes, navets, feuilles de Hêtre ou de Chêne stériles.

A partir de cette époque, ce même auteur obtient en collaboration avec **MATRUCHOT** une série de belles cultures sur milieux stérilisés : celles de *Psalliota campestris* [9], *Amanita rubescens*, *Lepiota procera*, *Armillaria mellea*, *Collybia velutipes*, celui-ci sur morceaux de

bois, *Marasmius oreades*, *Pholiota ægerita*, *Coprinus comatus*, *Polyporus tuberaster*, *Polyporus frondosus*, *Hydnum coralloides*, *Morchella esculenta*, *Peziza coccinea*, et obtient même la fructification de *Collybia velutipes* et *Hydnum coralloides* [10]. De même, **MATRU-CHOT** [11] cultive facilement des ascospores de *Bulgaria sarcoides* sur des tranches de carottes stérilisées, de *Nectria Peziza* var. α sur des tranches de pommes de terre.

VIALA et **PACOTTET** [12], au cours de leurs études sur le Black rot, ensemencent un fragment de mycélium, une première fois sur moût de raisins arrivés aux deux tiers de leur grosseur et stérilisé à basse température, puis, après deux ou trois passages successifs sur ce même milieu, le bouturent facilement sur divers milieux liquides ou solides, à la condition que ces milieux soient additionnés de 5 0/00 d'acides organiques (surtout malique ou tartrique) et de 20 0/00 de sucre (réduit en glucose à l'autoclave). Les meilleurs milieux sont le jus de raisins verts et le bouillon de haricots. Leurs recherches se poursuivent alors sur l'Anthracnose [13], dont ils obtiennent une première culture sur jus de jeunes feuilles de Vigne, solidifié à la gélose et stérilisé à basse température, après quoi ils ensemencent facilement sur jus de raisins jeunes. Puis ils obtiennent une première germination de *Ræsleria* [14], sur du bouillon de haricots sucré, acidulé à l'acide tartrique (sucre 5 0/0 et acide 1 0/00) à 20°-25°, suivie de bouturages sur divers milieux. Enfin ils cultivent dans les mêmes conditions le *Stereum necator* **VIALA** [15], parasite de la maladie de la Vigne connue sous le nom de l'Esca.

En 1918, Mlle **BENSAUDE** [16] fait germer des spores de Coprins en cultures cellulaires sur des milieux liquides tels que les décoctions de pruneaux, de fumier, de carottes, et même dans de l'eau pure. L'année suivante

BOYER [17] ensemence des fragments du pied et du chapeau de différents Basidiomycètes sur divers liquides appropriés, sur fumier, tranches de carottes, etc... et obtient fréquemment de très beaux développements mycéliens. La fructification normale se produit assez rarement, sauf avec le *Lentinus tigrinus* sur carotte gélose.

EL. et **EM. MARCHAL** [18], étudiant ensuite l'homothallisme des Ascomycètes, cultivent diverses Sordariées : *Hypocopa fimicola* **SACC.**, *Philocopa macrospora*, *Sordaria tetraspora* **WINT.**, *Philocopa (Podospora) setosa* **SACC.**, *Philocopa curvicolla* **SACC.**, *Sporormia intermedia* **ANESW.**, et des *Chætodium* sur carottes, pommes de terre glycélinées, agar au moût de bière, agar de **HOPKINS** (à la pulpe de pomme de terre), sur lesquels ils obtiennent même la fructification normale d'*Hypocopa fimicola* et des *Chætodium*. Le milieu de choix pour les Sordariées fimicoles est représenté par des brindilles de pommier réparties en tubes de culture et stérilisées.

SARTORIS [19] constate qu'*Ustilago Zeae* germe quand les spores secondaires sont placées sur de l'agar glycéliné, de même que *Tilletia tritici* et *Tilletia foetens* sur agar riche en farine d'avoine, et **COOLEY** obtient du *Sclerotinia cinerea* sur décoction de pruneaux et suc de cerises.

VANDENDRIES [20] fait toute une étude sur la sexualité des Basidiomycètes qu'il cultive sur divers milieux. Il obtient tout d'abord la germination des spores de *Collybia velutipes* et d'*Hypholoma fasciculare* dans du moût d'orge de faible densité, stérilisé et réparti en gouttes pendantes dans des cellules de **VAN TIEGHEM**. Puis il cultive *Collybia velutipes* sur des milieux très divers, tant liquides que solides : pain arrosé de moût, jus de pruneaux, malt épuisé, vieux bois vermoulu arrosé de liquide nutritif, de même que des espèces coprophiles

telles que *Panaeolus separatus*, *Panaeolus fimicola* et *Coprinus stercorearius* sur une décoction de crottin de cheval à l'agar, stérilisée. Enfin, il cultive *Coprinus radians* sur une décoction de crottin frais, ainsi que *Coprinus micaceus* sur du moût d'orge gélosé et additionné d'une décoction concentrée de crottin frais [21].

DOW VAWTER BAXTER [22] dans ses études sur la biologie et la pathologie des Champignons destructeurs du cœur des bois durs, cultive le *Polyporus hispidus* sur plusieurs milieux tels que la carotte, la farine d'avoine, la pomme de terre, l'extrait de malt, la farine de blé, la pectine, gélosés, la gélose de **DUGGAR**, la sciure de Frêne noir, gélosée, des décoctions variées de sciure et d'extrait de malt. Il cultive également *Fomes Everhartii* sur extrait de malt gélosé, sur gélose au bois de Peuplier noir pourri, et sur ce même bois employé seul.

Mais tous les milieux précédents sans exception : carottes, navets, pommes de terre, simples ou glycéринées ou additionnées de substances nutritives, décoctions végétales liquides ou solidifiées par l'agar, végétaux eux-mêmes, capables de servir naturellement de support aux organismes considérés et qui ont, en général, donné des résultats satisfaisants dans les cas particuliers pour lesquels ils ont été employés, présentent cependant de sérieux désavantages.

Tout d'abord, ils ne sont applicables, la plupart du temps, qu'aux seuls cas pour lesquels ils ont été imaginés, et les méthodes ne peuvent ainsi être généralisées. Ils sont, ensuite, d'une composition essentiellement variable et, malgré le mode de préparation donné nécessairement par les auteurs pour permettre de les reproduire dans des conditions aussi semblables que possible, ils présentent entre eux des divergences telles qu'ils ne peuvent servir à des recherches biologiques sérieuses.

Ces considérations amènent ainsi les savants à rechercher des milieux artificiels faciles à reproduire.

BEAUVÉRIE [23], en 1900, avait déjà cultivé, outre des moisissures et quelques *Oospora*, des *Botrytis* sur divers milieux, les uns naturels, les autres artificiels : milieux complets, liquide de **RAULIN**, milieux dont l'azote provient de différents sels ammoniacaux : azotate ou tartrate, ou de substances organiques : bouillon de viande, de peptone, décoction de crottin, urine, albumine, etc... ; solution sans azote : modification du liquide de **RAULIN** ; milieux enfin dans lesquels le carbone et l'azote sont à la fois représentés : fruits, carottes, pommes de terre, ou dans lesquels il existe seulement un aliment carboné : amidon, glycérine, huiles, sucres, acides organiques.

C'est surtout à **LUTZ** [24] qu'on doit la possibilité de cultiver les Champignons sur milieux artificiels pouvant être reproduits dans des conditions toujours identiques à elles-mêmes. Il donne, en effet, en 1925, la formule de deux milieux, l'un dans la composition duquel entre encore un macéré de sciure de bois de Hêtre blanc, particulièrement favorable à la culture des Hyménomycètes lignicoles, l'autre de composition tout artificielle et constante, sur lequel on peut actuellement cultiver la plupart des Champignons supérieurs.

Ce dernier milieu convient en particulier à l'étude de la nutrition azotée de ces Champignons, étroitement liée à celle de la réaction du milieu.

Cette dernière question a depuis longtemps préoccupé les chercheurs : on savait que les Champignons manifestaient une préférence marquée pour l'acidité, que la neutralité leur convenait encore, mais que tout développement s'arrêtait en milieu alcalin. Quelles étaient les causes de cette préférence, quelles étaient les limites exactes du développement, c'est autant de questions qui restaient sans réponse ; les milieux naturels auxquels on

s'adressait répondaient aux besoins : on ne cherchait pas davantage.

TUBŒUF [25], en 1903, avait donné quelques renseignements sur la question : ensemencant du *Merulius lacrymans* sur du phosphate monosodique, il constate le développement mycélien du Champignon. Par contre, le mycélium n'apparaît ni sur le phosphate disodique ni sur le phosphate trisodique. Reprenant la même série d'expériences sur les sels de potassium et d'ammonium, il arrive aux mêmes résultats et conclut que le développement est arrêté dans les solutions alcalines, mais non dans les solutions acides.

Après lui, Mlle **RUMBOLD** [25], en 1908, détermine l'impuissance des Agaricacées et, en particulier, de *Schizophyllum commune*, *Lenzites sæpiaria*, *Pholiota adiposa* et *Armillaria mellea*, à pousser sur un milieu alcalin. Elle ensemence les organismes précédents sur différentes solutions et constate qu'ils poussent encore sur une solution neutre ou à peine alcaline, mais qu'ils donnent dans ces conditions un poids de mycélium moindre que lorsqu'ils sont obtenus dans des solutions légèrement acides. On sut depuis que cette acidité correspondait à un *Ph* initial voisin de 5-6 et que le développement s'arrêtait totalement du côté alcalin à *Ph* 8.

Elle constate de même que les Champignons poussent rapidement dans un milieu acide consistant en une solution de **KNOP** additionnée de sucre de raisin et gélosée, surtout si on ajoute 0,25 0/0 d'acide sulfurique. En ajoutant du carbonate de soude rien ne pousse plus.

De même **ZELLER** [26], cultivant l'année suivante quatre Champignons lignicoles : *Lenzites sæpiaria*, *Fomes pinicola*, *Polystictus versicolor* et *Polyporus hispidus* sur de l'agar de **THAXTER** à la pomme de terre glucosée, constate qu'ils poussent à peine si le milieu est alcalin, mais se développent bien si le milieu présente une faible

acidité, et **BOYER** [17] remarque qu'en général les milieux neutres, peu acides et peu alcalins, sont favorables. Ce dernier constate même que l'azotate de potasse ajouté dans des cultures en milieux stérilisés ne produit pas de meilleur résultat.

A partir de 1915, l'importance de la notion de concentration se précise et favorise les divers travaux de l'école américaine. Toutefois, le milieu artificiel de choix n'étant pas encore trouvé, le mode d'investigation est encore indécis : on s'adresse à la fois à des milieux naturels et à leurs dérivés et à des milieux chimiques.

MEACHAM (M. R.) [27] constate que divers Champignons tels que *Lenzites sepiaria*, *Fomes roseus*, *Coniophora cerebella* et *Merulius lacrymans* donnent un développement maximum à *Ph* 3 ; le développement est bon jusqu'à *Ph* 2.6, puis décroît jusqu'à *Ph* 1.9, pour s'arrêter totalement à *Ph* 1.7.

SCHMITZ [28] étudie l'action de l'acidité sur les Champignons lignicoles suivants : *Fomes pinicola* (**FRES.**) **SACC.**, *Lenzites sepiaria* (**WULF.**) **FRES.**, *Polystictus versicolor* (**L.**) **FRES.**, sur une infusion de carotte gélosée. Avec **ZELLER** et **DUGGAR** [29] il ensemece les spores de douze espèces de Champignons destructeurs de bois sur milieux très divers : milieux de **CZAPEK**, **DURHAM**, **REED**, **RICHARD**, et sur décoctions de pin et sève d'*Acer saccharinum*, milieux tous compris entre *Ph* 4.8 et *Ph* 8.6. Ils constatent [30] même que le *Polystictus versicolor* pousse lentement sur milieu de **CZAPEK** au phosphate neutre de potasse de *Ph* initial 8.6 et qu'il fait passer celui-ci à 4.8 en 30 jours. Sur ce même milieu, le *Daedalea confragosa* fait tomber la solution à *Ph* 8.4. Enfin ils observent que les Champignons destructeurs des bois ne réagissent pas de la même façon vis-à-vis des solutions à peine alcalines.

WEBB [31] étudie en 1919 la germination des spores

de moisissures diverses et de Champignons lignicoles sur des milieux très variés : solutions de mannite, de peptone, milieu de **CZAPEK**, solutions pures d'acides phosphorique ou chlorhydrique, de potasse ou de soude, décoctions de betteraves. Il constate que les limites d'acidité sont très variables suivant les espèces et, dans une même espèce, suivant les conditions initiales de l'expérience et, en particulier, le *Ph* du milieu nutritif. Pour les spores de *Lenzites sæpiaria*, en particulier, il faut un *Ph* compris entre 7 et 3.1-2.8.

En 1921 [32], ce même auteur montre que l'acidité croissante depuis la neutralité jusqu'à *Ph* 3-4 des différentes solutions précédentes influence favorablement la germination des spores de *Lenzites sæpiaria* et autres. La concentration en ions acides agit diversement sur le pourcentage, suivant l'organisme envisagé, le milieu de culture et la réaction initiale de celui-ci. C'est la décoction de betteraves qui donne le meilleur rendement, les solutions pures d'acide phosphorique et de soude, le plus faible.

SARTORIS [19], en même temps qu'il ensemence ses Hypodermés sur milieux naturels, constate que le développement mycélien de l'*Ustilago Zeae* est abondant sur une solution de maltose à 5 0/0. « *L'addition de nitrates de potasse et de chaux favorise la formation de mycélium de Tilletia tritici et Tilletia foetens, tandis que celle de sulfate de potasse et de phosphate monopotassique l'entrave. L'inverse se produit pour les divers Ustilago et dans ce dernier cas, le sulfate de potasse et le phosphate monopotassique favorisent même la conjugaison des spores secondaires et la formation de spores quiescentes lorsqu'ils sont ajoutés à une solution maltosée. Toujours les Ustilaginées étudiées se développent mieux sur un milieu légèrement acide.* »

Les Américains poursuivent leurs études sur les Champignons destructeurs des bois durs. **WOLPERT** [33] cul-

live ainsi *Polystictus adustus* (WILLD.) FR.; *Polystictus versicolor*. (L.) FR.; *Pleurotus ostrealus* JACQ.; *Schizophyllum commune* FR.; *Pholiota adiposa* FR.; *Lenzites saepiaria* (WULF.) FR.; *Armillaria mellea* (WAHL.) QUEL. et *Daedalea confragosa* (BOLT.) FR. sur agar à la pomme de terre. Après que le mycélium est bien développé, il le transporte dans de grandes fioles contenant des tiges et des cosses de haricots, du bois pourri et stérilisé, ce même bois mélangé à des feuilles pourries elles-mêmes et le tout stérilisé. Il emploie encore comme milieux de culture :

1° Une solution de **RICHARD** modifiée, de *Ph* compris entre 2.5 et 8, et une solution de peptone additionnée ou non de sucre et ajustée entre *Ph* 2 et *Ph* 8.7.

2° Un deuxième groupe de milieux dérivant du milieu de **RICHARD**, dans lequel l'élément carboné provient de différentes celluloses : du Pin, du Chêne blanc, de l'Erable à sucre, du Peuplier. On prépare ainsi un milieu soit liquide, et ajusté entre *Ph* 3 et *Ph* 6, soit solidifié à l'agar, et dont les concentrations acides sont successivement, 2-8,4 (*Ph* initial), 4-6,5 et 6. D'autres milieux sont à base de la solution de peptone ci-dessus (1°), dont la cellulose provient d'une addition de papier filtre et qui donnent un *Ph* compris entre 2 et 8.7.

WOLPERT constate en particulier que *Polystictus versicolor* germe de *Ph* 2.5 à *Ph* 7.6 et *Daedalea confragosa* (BOLT.) FRES. de *Ph* 3.5 à *Ph* 7.2, sur solution de **RICHARD** ; la germination se fait encore jusqu'à *Ph* 8.5 sur solution de peptone.

BOYLE [34], étudiant la germination des spores de *Botrytis cinerea* FR. sur milieu de **RICHARD** et décoction de pommes, observe que cette germination est arrêtée en deçà de *Ph* 1.7 et au delà de *Ph* 9.5, sur milieu de **RICHARD**, en deçà de *Ph* 2.2 et au delà de *Ph* 9.5 sur décoction de pommes en passant par un maximum à *Ph* 8.

WEISS [35] constate que l'infection de la pomme de terre due au *Synchytrium endobioticum* **SCHILB.**, dépend, outre la variété de pomme de terre expérimentée, l'humidité et la température, de la réaction du milieu qui doit être d'un *Ph* compris entre 3.9 et 8.5.

Enfin **KILLIAN** [36] publie en 1926 une étude sur les caractères culturels du *Vermicularia Eryngii*. Il en obtient le développement sur une solution minérale renfermant du sulfate de magnésie et du phosphate monopotassique à laquelle il ajoute, d'une part, du glucose en quantité variable, d'autre part, un composé azoté soit minéral, soit organique. Il observe que, sur ces milieux, « l'aspect des colonies dépend en première ligne de la quantité et de la qualité de la source azotée, lorsque celle-ci est organique, de la teneur en glucose, lorsqu'on se sert du nitrate de potasse. Le développement est moindre si on remplace le nitrate de potasse par du sulfate de potasse, et meilleur si on lui substitue du citrate d'ammoniaque. **KILLIAN** explique le fait par la toxicité de l'acide sulfurique provenant de la dégradation du sel, alors que, dans ces mêmes conditions, l'acide citrique, non seulement n'est pas toxique, mais sert d'aliment carboné au Champignon.

Les connaissances en étaient à ce point lorsque parut le travail de **BACH** [37] sur « la nutrition azotée de l'*Aspergillus repens* ». Bien avant lui, **LUTZ** [38], en 1899, avait fait des recherches sur la question, utilisant le *Sterigmatocystis nigra* et le *Penicillium glaucum*. Mais, contrairement aux milieux généralement employés, celui de **LUTZ** était à base de liquide de **RAULIN** neutre. C'est le travail de **BACH** qui a expliqué la plupart des incertitudes et résolu les difficultés antérieures.

Les analogies qui existent entre la vie des Champignons inférieurs et celle des Champignons supérieurs, et qui ont toujours engagé les différents auteurs à mener

parallèlement leurs expériences sur ces deux catégories de végétaux, permettent de se demander quelle est la valeur de ces dernières connaissances pour ces organismes supérieurs, et les Hyménomycètes en particulier. Comment l'absorption de l'azote se fait-elle chez ceux-ci ? Les sels azotés du milieu de **LUTZ**, pourtant si favorable à leur développement, se présentent-ils bien en réalité sous la forme la meilleure ? C'est ce que je me suis efforcée de mettre en lumière.

C'est pour nous un agréable devoir, en terminant cette introduction, de remercier M. le Professeur Radais, doyen de la Faculté de Pharmacie, pour avoir si aimablement mis son laboratoire à notre disposition. Qu'il veuille bien trouver ici l'assurance de notre vive reconnaissance pour l'intérêt qu'il a toujours porté à notre travail et l'appui constant que nous avons trouvé près de lui. Nous sommes heureuse de lui exprimer notre attachement respectueux.

Nous ferons part également de notre profonde gratitude à M. Lutz, Professeur Agrégé, qui nous a suggéré cette étude. Encourageant avec bienveillance des efforts qui, bien souvent, sans lui, eussent été vains, guidant nos expériences, prodiguant ses conseils, il a été pour nous le maître le plus aimable. Son activité infatigable nous a donné l'exemple de la persévérance dans les recherches et l'amour du travail de laboratoire.

A M. Bach, Pharmacien des Hôpitaux, nous adressons tous nos remerciements. Il nous a initiée à des notions et à des méthodes nouvelles pour nous, nous faisant profiter de ses connaissances approfondies sur les notions de réaction des milieux. En lui, également, nous avons toujours trouvé le plus bienveillant conseiller. Qu'il veuille bien croire à notre profonde reconnaissance.

LES MÉTHODES D'ÉTUDE

I. — LES ORGANISMES ÉTUDIÉS

J'avais tout d'abord entrepris la culture d'un nombre assez important d'Hyménomycètes : *Fomes pinicola*, *Ungulina betulina*, *Tremella mesenterica*, *Stereum hirsutum*, *Pleurotus nebrodensis*, *Stereum pupureum*, *Coriolus versicolor*, *Fomes igniarius*, *Trametes medullapanis*, *Coriolus adustus*, *Corticium quercinum*. On trouvera plus loin les résultats qu'ils m'ont fournis.

Mais devant la complexité de ces résultats, j'ai préféré, par la suite, limiter mes recherches et m'occuper plus particulièrement du développement du *Corticium quercinum* et du *Stereum purpureum* qui présentent l'avantage de donner un poids de mycélium assez important et de déterminer des changements notables dans la composition du milieu étudié.

II. — MILIEU DE CULTURE

A) *Composition du milieu.* — Le milieu initial est le milieu de **LUTZ** [24].

Xylose	5 gr. 00
Maltose.	5 gr. 00
Phosphate d'ammoniaque.	} ââ 1 gr. 00
Azotate d'ammoniaque	
Sulfate de magnésie	0 gr. 10
Sulfate de manganèse	0 gr. 05
Sulfate de fer.	0 gr. 05
Gélose	20 gr. 00
Eau Q. S. pour.	1.000 gr. 00

J'ai dû cependant faire subir quelques transformations à ce milieu, d'abord en raison du prix élevé du xylose, puis pour la commodité des expériences.

La première de ces raisons m'a amenée à employer un milieu uniquement maltosé à 1 0/0. Deux séries d'expériences faites, l'une sur le milieu initial, l'autre sur le milieu maltosé, m'ont en effet permis de constater que le développement mycélien, quoique un peu retardé dans le second cas, reste cependant assez abondant pour justifier son emploi.

D'autre part, j'ai augmenté la quantité de sulfate de magnésie qui a été portée à 0,492, ce qui correspond à une solution N/500 de ce sel. J'ai supprimé le sulfate de fer : le fer est, en effet, employé par les organismes considérés en quantité si faible, que les impuretés amenées par les différents sels employés en apportent une quantité suffisante.

Bien que m'adressant à des espèces ayant une préférence marquée pour les substrats solides, j'ai de même supprimé la gélose qui oppose des obstacles insurmontables à la détermination pondérale du mycélium formé et à l'examen chimique du liquide de culture.

La formule du milieu est ainsi devenue :

<i>Mallose</i>		10 gr. 00
<i>Phosphate d'ammoniaque</i>	} à à	1 gr. 00
<i>Azotate d'ammoniaque</i>		
<i>Sulfate de magnésie</i>		0 gr. 492
<i>Sulfate de manganèse</i>		0 gr. 05
<i>Eau bi-distillée Q. S. pour</i>		1.000 gr. 00

J'ai fait ensuite varier dans ce milieu l'élément azoté de manière à étudier l'influence des principales formes de l'azote sur le développement des Champignons. Tous les composés azotés ont été employés à l'état de solutions N/10 en azote. Les sels utilisés sont des produits **POULENC**. Ils ont été recristallisés deux fois dans de l'eau distillée. Le maltose, qui provenait de la maison

BILLAULT, était suffisamment pur pour être utilisé immédiatement.

L'eau distillée a été redistillée une première fois sur du bichromate de potasse et de l'acide sulfurique, et une seconde fois sur de l'eau de baryte. Elle a été recueillie à l'abri du gaz carbonique de l'atmosphère dans un flacon bouché par une ampoule de chaux sodée. On obtient ainsi une eau de *Ph* 6.4-6.6, que l'on conserve en flacons de petite capacité paraffinés et bien bouchés.

B) *Détermination de la réaction des milieux*. — La réaction des milieux a été déterminée par la méthode colorimétrique de **CLARK** et **LUBS**.

Nous ne voulons pas exposer ici la théorie de la mesure de la concentration en ions Hydrogène par la méthode colorimétrique que l'on trouve aujourd'hui dans les ouvrages classiques. Nous en rappelons seulement les principes.

On peut préparer, avec des mélanges convenablement choisis de sels d'acides faibles et de bases fortes, additionnés d'acides ou de bases fortes, des séries de milieux tampons faciles à reproduire avec exactitude, et dont les concentrations en ions Hydrogène, déterminées une fois pour toutes, avec l'électrode à Hydrogène, sont connues. Ces mélanges peuvent être choisis de façon à couvrir une portion plus ou moins importante de l'échelle des *Ph*.

On peut choisir, d'autre part, des indicateurs acidimétriques dont les zones de virage soient distinctes et occupent bout à bout toute l'échelle des *Ph*.

Si on ajoute chacun de ces indicateurs en quantité calculée aux mélanges tampons correspondant à sa zone de virage, on obtient une série d'échelles colorées à teintes dégradées. Les échelles une fois construites permettent, par la comparaison des teintes obtenues avec les milieux à essayer, d'en déterminer la concentration en ions Hydrogène.

SÖRENSEN a le premier établi de telles échelles. Mais à l'heure actuelle, on emploie plus couramment les milieux tampons de **CLARK** et **LUBS**, avec les indicateurs de la série des sulfones phtaléines, qui donnent des nuances particulièrement brillantes.

Pour établir ces échelles, il faut tout d'abord préparer les solutions suivantes (39) :

1° Une solution de HCl $\text{N}/5$. Cette solution est préparée d'après la méthode pondérale de **VILLIERS** (à l'état de chlorure d'ammonium) ;

2° Une solution de soude $\text{N}/5$. Cette solution est faite avec de l'eau bi-distillée privée de CO_2 par ébullition et de la soude privée de carbonate. Cette soude est obtenue en dissolvant 100 grammes de soude pure du commerce dans 100 grammes d'eau pure. Le carbonate de soude est insoluble dans la soude à cette concentration. Au bout de deux ou trois jours on décante le liquide clair et on prépare la solution de soude $\text{N}/5$. Elle est exactement titrée par rapport à la solution d' HCl $\text{N}/5$ précédente et conservée en flacons paraffinés ;

3° Une solution $\text{N}/5$ de phtalate acide de potassium. Dissoudre 40 gr. 828 de phtalate acide pur et amener à 1 litre avec de l'eau bi-distillée dans une fiole jaugée ;

4° Une solution $\text{N}/5$ de phosphate monopotassique. Dissoudre 27 gr. 231 de $\text{PO}_4 \text{H}^2 \text{K}$ pur séché à 100° et amener à 1 litre ;

5° Une solution d'acide borique $\text{N}/5$. Dissoudre 12 gr. 4048 d'acide borique séché dans le vide sur du chlorure de calcium ou de l'acide sulfurique et amener à un litre ;

6° Une solution de chlorure de potassium $\text{N}/5$. Dissoudre 14 gr. 912 de KCl séché à 120° jusqu'à poids constant et compléter à 1 litre.

Ces diverses solutions servent à obtenir des solutions étalons dont nous donnons ci-après les formules.

Solution tampon KCl N/5 50 cm ³ , ajouter HCl N/5				Ph.
—	—	—	64 cm ³ 5	1.2
—	—	—	41 cm ³ 5	1.4
—	—	—	26 cm ³ 3	1.6
—	—	—	16 cm ³ 6	1.8
—	—	—	10 cm ³ 6	2.0
—	—	—	6 cm ³ 7	2.2
Solution tampon phthalate acide de K N/5, 50 cm ³ , ajouter HCl N/5				2.2
—	—	—	46 cm ³ 7	2.4
—	—	—	39 cm ³ 6	2.6
—	—	—	32 cm ³ 95	2.8
—	—	—	26 cm ³ 42	3.0
—	—	—	20 cm ³ 32	3.2
—	—	—	14 cm ³ 7	3.4
—	—	—	9 cm ³ 9	3.6
—	—	—	5 cm ³ 97	3.8
—	—	—	2 cm ³ 63	4.0
Solution tampon phthalate acide de potasse 50 cm ³ , ajouter NaOH N/5				4.2
—	—	—	0 cm ³ 4	4.4
—	—	—	3 cm ³ 7	4.6
—	—	—	7 cm ³ 5	4.8
—	—	—	12 cm ³ 15	5.0
—	—	—	17 cm ³ 7	5.2
—	—	—	23 cm ³ 85	5.4
—	—	—	29 cm ³ 95	5.6
—	—	—	35 cm ³ 45	5.8
—	—	—	39 cm ³ 85	6.0
—	—	—	43 cm ³ 0	6.2
—	—	—	45 cm ³ 45	
—	—	—	47 cm ³ 0	

Solution tampon phosphate acide de K N/5. 50 cm ³ , ajouter NaOH N/5					Ph.
—	—	—	3 cm ³	72 compléter à 300 cm ³ avec eau bi-distillée	5.8
—	—	—	5 cm ³	7	6.0
—	—	—	8 cm ³	6	6.2
—	—	—	12 cm ³	6	6.4
—	—	—	17 cm ³	8	6.6
—	—	—	23 cm ³	65	6.8
—	—	—	29 cm ³	63	7.0
—	—	—	35 cm ³	0	7.2
—	—	—	39 cm ³	5	7.4
—	—	—	42 cm ³	8	7.6
—	—	—	45 cm ³	2	7.8
—	—	—	46 cm ³	8	8.0
Sol. tamp. d'acide borique N/5, 50 cm ³ ; ajout. KCl N/5, 50 cm ³ ; ajout. NaOH N/5					7.8
—	50 cm ³	—	2 cm ³	61	8.0
—	50 cm ³	—	3 cm ³	97	8.2
—	50 cm ³	—	5 cm ³	9	8.4
—	50 cm ³	—	8 cm ³	5	8.6
—	50 cm ³	—	12 cm ³	0	8.8
—	50 cm ³	—	16 cm ³	3	9.0
—	50 cm ³	—	21 cm ³	3	9.2
—	50 cm ³	—	26 cm ³	7	9.4
—	50 cm ³	—	32 cm ³	0	9.6
—	50 cm ³	—	36 cm ³	85	9.8
—	50 cm ³	—	40 cm ³	8	10.0
—	50 cm ³	—	43 cm ³	9	

Les indicateurs colorés employés sont les suivants :

Indicateurs	Série de Clark Virage	Limite de virage Ph	Zone utile Ph (utili- sable avec les milieux colorés en jaune).
Thymolphtaléine sulfonée (bleu de thymol)	rouge à jaune	1.2 — 2.8	
Tétrabromophénolphtaléine sulfonée (bleu de bromo- phénol).	jaune au bleu	3.0 — 4.6	4.0 — 4.6
Orthocarboxybenzène azodi- méthylaniline (rouge de méthyle).	rouge au jaune	4.4 — 6.0	4.4 — 6.0
Dibromoo orthocrésolphta- léine sulfonée (pourpre de bromocrésol).	jaune au violet	5.2 — 6.8	5.4 — 6.6
Dibromothymolphtaléine sulfonée (bleu de bromo- thymol).	jaune au bleu	6.0 — 7.6	6.0 — 7.6
Phénolphtaléine sulfonée (rouge de phénol).	jaune au rouge	6.8 — 8.0	6.8 — 8.0
Orthocrésolphtaléine sul- fonée (rouge de crésol).	jaune au rouge	7.2 — 9.0	7.4 — 9.0
Thymolphtaléine sulfonée (bleu de thymol).	jaune au bleu	8.0 — 9.6	8.6 — 9.6

Toutes les solutions obtenues avec ces colorants sont des solutions diluées à 500 cm³ avec de l'eau bi-distillée de 0 gr. 1 de produit dans

- 5 cm³ 7 de soude N/20 pour le rouge de phénol.
- 5 cm³ 3 — pour le rouge de crésol.
- 4 cm³ 3 — pour le bleu de thymol.
- 3 cm³ 0 — pour le bleu de bromophénol.
- 3 cm³ 2 — pour le bleu de bromothymol.
- 3 cm³ 7 — pour le violet de bromocrésol.

sauf pour la solution de rouge de méthyle. Celle-ci est une solution diluée à 500 cm. avec de l'eau bi-distillée de 0 gr. 1 de colorant dans 300 cm³ d'alcool.

Les solutions colorantes sont conservées dans des flacons dont le bouchon émeri est constitué par un compte-gouttes à téline. On obtient ainsi un mesurage des gouttes très précis et on évite l'évaporation de la solution et l'action du CO_2 atmosphérique.

Les échelles étalons sont obtenues par addition de 10 gouttes de solution colorante appropriée dans 10 cm³ de chaque solution étalon, placée dans des tubes à essais de mêmes dimensions. On bouche avec des bouchons de liège paraffinés. Les proportions doivent toujours être respectées pour un même travail.

Pour plus de sécurité, les solutions étalons ont toutes été vérifiées au potentiomètre : elles indiquaient un *Ph* très légèrement supérieur au *Ph* théorique, mais cette différence étant constante pour chacune d'elles, on peut considérer les résultats comme satisfaisants.

Le comparateur employé est celui de **BACH** 37. Je rappelle que ce comparateur « est un bloc de bois percé de trois séries de deux trous parallèles ; chaque série est éclairée par une fenêtre latérale. Le bloc de bois est lui-même disposé au fond d'une boîte de bois, noircie intérieurement, dont la profondeur correspond à la distance minima de vision distincte ; le tout est monté sur un chevalet qui permet de maintenir l'appareil sous un angle de 30° par rapport à l'horizontale. Les rayons incidents sont tamisés par un verre dépoli, ou suivant les cas par des verres rouges ou bleus ».

La détermination du *Ph* initial du milieu et l'ajustage ont été faits après stérilisation, cette opération amenant parfois quelques variations de l'acidité surtout lorsqu'on s'adresse à des milieux minéraux.

Le *Ph* final, après culture, a été déterminé sur une prise d'essai non filtrée. Je n'ai jamais obtenu de culture sur un milieu dont le *Ph* était inférieur à 3.2, ni supérieur à 8.6. Dans ces conditions, les seules échelles

étaions employées sont celles du bleu de bromophénol, du rouge de méthyle, du violet de bromocrésol, du bleu de bromothymol et du rouge de phénol. Le rouge de méthyle, le violet de bromocrésol et le bleu de bromothymol sont les plus communément utilisés.

C) *Stérilisation des milieux*. — Tous les milieux ont été stérilisés à l'autoclave pendant un quart d'heure à 120°, sauf le milieu à l'urée, qui dans ces conditions serait hydrolysé.

Celui-ci a été stérilisé par filtration à la bougie dans l'appareil répartisseur et jaugeur de **BACH** [40] préalablement stérilisé.

III. — LES CONDITIONS DE CULTURE

La marche suivie pour les expériences est celle préconisée par **BACH** [37].

Il faut ensemercer simultanément une série de fioles de même verre, de même forme et de mêmes dimensions. Il a été fait choix de fioles d'**ERLENMEYER** de 250 cm³ en verre France.

Dans une série de fioles, on répartit 25 cm³ de milieu exactement mesurés à la pipette à deux traits, et on stérilise à l'autoclave à 120° pendant 20 minutes.

Le lendemain de la stérilisation, quand le milieu s'est mis en équilibre avec le gaz carbonique atmosphérique, on procède à l'ajustage à *Ph* 7.

Pour cela, on détermine sur une prise d'essai de 10 cm³ la quantité de soude N/5 nécessaire pour l'amener à *Ph* 7 (1).

Le chiffre obtenu, moyenne des quatre déterminations portant sur deux fioles différentes, est multiplié par 2,5,

(1) La soude N/5 a été préalablement stérilisée et les prélèvements qu'on fait sont réalisés d'une façon aseptique.

ce qui donne la quantité de soude N/5 à ajouter à chaque fiole pour amener à *Ph* 7 les 25 cm³ de milieu qu'elles contiennent. On fait cette addition aseptiquement, et les milieux sont prêts pour l'ensemencement.

Le mode d'ensemencement a demandé quelques tâtonnements en vue de déterminer les meilleures conditions permettant aux Champignons de vivre en aérobies sur milieux liquides. Je m'étais tout d'abord servi de Pyrex concassé, placé dans des fioles et destiné à servir de support au Champignon pour lui permettre de vivre en surface. Mais l'alcalinité du Pyrex ne disparaît pas, même après plusieurs passages à l'autoclave sous deux atmosphères de pression pendant une demi-heure, et cette alcalinité fausse les résultats. L'amiante, traitée de même, ne donne pas de meilleurs résultats. J'ai alors employé la technique préconisée par **DOW VAWTER-BAXTER** [22] en me basant sur les données fournies par **LUTZ** [41], à savoir que les Hyménomycètes poussent sur n'importe quel bois, lorsque celui-ci est privé de certaines substances antagonistes au développement et absentes de leur support spécifique. J'ai opéré de la façon suivante :

Des cubes de Hêtre blanc de 1 cm. de côté ont été délavés par deux passages successifs à l'autoclave, sous deux atmosphères de pression pendant trente minutes, dans de l'eau distillée employée dans la proportion de dix centimètres cubes par cm³ de bois, puis répartis dans des tubes à pomme de terre et stérilisés un quart d'heure à 120°. Les blocs ne changent plus sensiblement la réaction d'un liquide dans lequel ils sont plongés, même après 24 heures de macération. Ils sont ensuite ensemencés avec les Champignons choisis. Au bout de quinze jours ceux-ci sont assez solidement fixés pour être transportés sans risque dans les fioles contenant le liquide à étudier et pour y vivre en surface, maintenus

qu'ils sont par le cube de Hêtre. On obtient alors un voile plus ou moins dense suivant le Champignon étudié et la valeur nutritive du milieu sur lequel il se trouve.

Les cultures ont été faites à la température du laboratoire, c'est-à-dire entre 18° et 22°. J'ai prélevé une fiole tous les deux jours, à partir du huitième jour, temps qui est généralement nécessaire pour obtenir un poids de mycélium suffisant pour être pesé. Toutes les fois que cela a été possible, les expériences ont duré un mois.

Dans chaque série d'expériences, j'ai fait quelques cultures sur les mêmes milieux gélosés, cultures destinées à vérifier les résultats obtenus sur milieux liquides, ceux-ci donnant en général des résultats inférieurs aux milieux solides.

IV. — ÉTUDE DE LA RÉCOLTE ET DU LIQUIDE DE CULTURE

A) *Réaction finale du liquide de culture*. — Comme il a déjà été dit, le *Ph* final est déterminé à la façon habituelle sur une prise d'essai du milieu non filtré, les papiers filtres donnant toujours une réaction alcaline.

B) *Pesée de la récolte*. — Dans le but de recueillir la totalité du mycélium, cette prise d'essai, ainsi que le reste du liquide de culture et le mycélium sont jetés sur un double filtre équilibré. Le mycélium est lavé à l'eau distillée tiède et les liquides sont recueillis dans un vase jaugé à 200 cc. Le filtre est ensuite porté à l'étuve à 100° pendant 24 heures et le mycélium est pesé.

Sur le filtrat, complété à 200 cc., on fait les déterminations suivantes :

C) *Dosage du sucre*. — Le dosage a été fait après hydrolyse du maltose par l'acide chlorhydrique à 1 0/0

au B. M. bouillant pendant 5 minutes. Le maltose est en effet transformé partiellement en glucose par la stérilisation et par la culture et il est nécessaire, pour obtenir des résultats comparables, de faire le titrage sur un produit uniforme. Ce dosage a été fait par le procédé de **BERTRAND** et le résultat exprimé en glucose.

D) *Dosage de l'ammoniaque.* — L'ammoniaque a été dosée par différence sur 20 cc. de filtrat après redistillation dans l'appareil de **MEILLÈRE** et **DE ST-RAT** (42). Elle est déplacée par de la soude, entraînée par un courant de vapeur d'eau et regue dans de l'acide chlorhydrique N/20 en présence de rouge de méthyle. L'excès d'acide chlorhydrique est titré à l'aide de soude N/20, en correspondance très exacte avec l'acide et conservée dans une burette automatique **MIGNON** fermée par une ampoule à chaux sodée qui la met à l'abri du gaz carbonique de l'air.

E) *Recherche de l'alcool éthylique.* — Les dosages précédents m'ayant permis de constater que l'absorption du sucre se continue, même après l'arrêt de l'assimilation azotée et du développement mycélien, j'ai pensé que ce sucre avait peut-être subi la fermentation alcoolique. J'ai recherché l'alcool par le procédé à l'iodoforme (1) et j'ai obtenu un résultat nettement positif. Le précipité ainsi formé est bien dû à la présence d'alcool et non pas à celle d'acétone, car la réaction de **DENIGÈS** (2) a également été positive dans tous les cas.

(1) Pour rechercher l'iodoforme, on ajoute 2 gouttes de lessive de soude par cm³ de solution. On chauffe à 40°-50° et on verse goutte à goutte de l'iode à 1 % environ jusqu'à coloration jaune brunâtre qu'on fait disparaître par une goutte de soude. Il se forme un dépôt d'iodoforme (Denigès, *Précis de chimie analytique*, p. 191).

(2) On met dans un tube autant de gouttes d'ammoniaque que de cm³ de liquide examiné et on ajoute quelques gouttes de la solution iodée : avec l'alcool il se produit un précipité gris noir permanent d'odore d'azote (Denigès, *Précis de chimie analytique*, p. 191).

Il y a intérêt à préciser le moment où apparaît cet alcool. Pour cela les organismes ont été ensemencés sur 250 cc. de différents milieux sucrés, placés dans une pissette à sérum. On prélevait tous les deux jours 10 cm³ de ces milieux pour la recherche qualitative de l'alcool. Malheureusement, ces prélèvements successifs changent constamment les conditions de vie du Champignon et les résultats manquent totalement de netteté.

F) *Dosage des phosphates.* — De même que pour l'assimilation du sucre et de l'azote, je m'étais aussi proposé de suivre la marche de l'assimilation du phosphore en utilisant la méthode de dosage de l'ion phosphorique de **DENIGÈS** [43]. Cette méthode colorimétrique est basée sur la comparaison des teintes obtenues avec la solution à titrer et deux solutions témoins à 0 mgr 05 et 0 mgr 1 de P² O⁵ par 10 cm³ d'eau lorsqu'on ajoute successivement dans ces solutions, d'une part 0 cm³ 4 de réactif sulfomolybdique et d'autre part 0 cm³ 1 de réactif stanneux. Les teintes plus ou moins bleues obtenues suivant la quantité de phosphate dissous sont comparées dans un colorimètre de **DUBOSQ**.

Mais il s'agit d'une méthode colorimétrique ici inapplicable, car le liquide d'où on part est lui-même coloré (maltose, pigments mycéliens), ce qui rend la comparaison des teintes tout à fait illusoire.

J'ai alors essayé de préparer des échelles colorées. A cet effet, j'ai dilué la solution type de phosphate monopotassique de façon que 1, 2, 3... 10 cm³ de cette solution correspondent à 0.01, 0.02, 0.03.... 0.1 milligramme de P² O⁵. Les prises d'essais de 10 cm³ du filtrat contenaient toujours une quantité de phosphate comprise entre ces limites. Les diverses quantités de solution de phosphate étaient alors additionnées des divers réactifs et on obtenait ainsi une gamme de couleurs graduées du

bleu pâle au bleu foncé à laquelle on pouvait comparer au comparateur du *Ph* le liquide à étudier additionné de différents réactifs.

Cette méthode est pratiquement inutilisable. L'expérience a montré qu'il fallait, pour la rendre applicable, que tous les sels employés proviennent du même échantillon et qu'on se serve des mêmes réactifs exactement en même temps et aussitôt après leur préparation.

J'ai alors essayé la méthode de **JAVILLIER** 44, basée sur la propriété que possède l'acide phosphomolybdique de former avec l'éther un liquide séparable dont le volume peut servir de mesure à l'acide phosphorique qui l'a produit. L'opération est faite dans des ampoules spéciales graduées et la lecture se fait après centrifugation.

Dans le cas particulier de l'expérience, les différences obtenues sont si faibles que les lectures sont impossibles. Ceci laisse dès maintenant supposer que l'absorption du phosphore est extrêmement faible dans ces conditions.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

PREMIÈRE PARTIE

ASSIMILATION DE L'AZOTE NITRIQUE

1. — *Nitrate d'ammoniaque.*

Ce sel est peut-être favorable pour obtenir la culture de certains microorganismes. Son emploi est essentiellement irrationnel dans les études qualitatives et quantitatives sur la nutrition azotée, puisqu'il fournit l'azote sous deux formes, nitrique et ammoniacale. Cependant son étude présente de l'intérêt. Il arrive souvent, en effet, que, par suite de l'assimilation presque égale de l'ion nitrique et de l'ion ammoniacal, l'un physiologiquement acide, l'autre physiologiquement alcalin, la réaction du milieu soit peu modifiée, ce qui peut être un avantage.

Cette étude m'a obligée à transformer la formule originale de **LUTZ**, où l'azote est fourni à la fois à l'état de phosphate et à l'état de nitrate. C'est une circonstance incompatible avec l'étude qualitative et quantitative du métabolisme azoté. Il convient donc, avec la plupart des physiologistes, de n'utiliser qu'un seul composé azoté et de fournir le phosphore sous forme de phosphate acide de potassium. Ce dernier sel possède seul parmi les constituants du milieu des propriétés tampons. C'est lui qui, avant ajustage, règle la réaction du milieu aux environs de *Ph* 4.8 *Ph* 5. La formule du milieu est devenue la suivante :

Mallose	10 gr. 00	
Nitrate d'ammoniaque.	2 gr. 00	N/20
Phosphate monopolassique.	1 gr. 36	N/100
Sulfate de magnésie.	0 gr. 49 ³	
Sulfate de manganèse.	0 gr. 05	
Eau bi-distillée Q. S. pour.	1.000 gr. 00	

J'aiensemencé sur ce milieu : *Fomes pinicola*, *Fomes igniarius*, *Stereum hirsutum*, *Stereum purpureum*, *Coriolus versicolor*, *Coriolus adustus*, *Ungulina betulina*, *Tremella mesenterica*, *Pleurotus nebrodensis*, *Trametes medullapanis*, *Corticium quercinum*.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

TABLEAU N° 1. — Milieu au nitrate d'ammoniaque.

	F. pinicola	U. betulina	T. mesenterica	S. hirsutum	P. nebrodensis	S. purpureum	C. versicolor	F. igniarius	T. medullapanis	C. adustus	C. quercinum
Ph initial... .	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
Ph final.....	2. 6	2. 8	3. 2	3. 4	3. 8.	3. 10	4. 8	5. 5	6	6	6
Poids du mycélium en gr.	0.037	0.004	0.08	0.015	0.03	0.039	0.017	0.034	0.035	0.062	0.069

Ce tableau montre :

1° que les Champignons des bois blancs acidifient davantage le milieu que les Champignons des bois durs ;

2° que certains Champignons tels que le *Corticium quercinum* donnent une quantité relativement grande de mycélium en ne provoquant qu'une faible acidification du milieu. Ceci pourrait s'expliquer à priori de la façon suivante :

Le Champignon absorbe tout d'abord l'azote ammoniacal du nitrate, acidifiant le milieu par suite de la mise en liberté de l'acide azotique. A un moment donné cette acidité est assez forte pour arrêter le développement mycélien. Deux cas pourraient alors se présenter : ou bien il y aurait protéolyse, ou bien il se ferait une absorption de l'azote nitrique. Dans les deux cas, il se produirait, au cours de cette phase de la végétation, une diminution de la concentration en ions H du milieu. La première de ces hypothèses doit être immédiatement écartée en raison de la trop faible quantité de mycélium formé et du grand excès de sucre. Pour rechercher si le Champignon est capable d'assimiler l'azote nitrique et vérifier la seconde hypothèse, il suffit de remplacer dans le milieu nutritif le nitrate d'ammoniaque par le nitrate de potasse.

II. — Nitrate de potasse.

Le milieu de culture est ainsi constitué :

<i>Maltose</i>	10 gr. 00	
<i>Nitrate de potasse</i>	10 gr. 1	N/10
<i>Phosphate monopotassique</i>	1 gr. 36	
<i>Sulfate de magnésie</i>	0 gr. 492	
<i>Sulfate de manganèse</i>	0 gr. 05	
<i>Eau bi-distillée Q. S.</i> pour	1.000 gr. 00	

Ce milieu a été réparti à la façon habituelle, stérilisé, ajusté à *Ph* 7 et ensemencé avec du *Stereum purpureum* et du *Corticium quercinum*. Les résultats sont indiqués dans les tableaux suivants. La fiole numérotée 1 a été prélevée 8 jours après l'ensemencement ; 2, deux jours plus tard, etc... Le *Stereum purpureum* n'a poussé que sur 9 des fioles ensemencées et les analyses ont ainsi été arrêtées 17 jours après le premier prélèvement. De même le *Corticium quercinum* a poussé sur 14 fioles et les ana-

lyses ont porté sensiblement sur un mois de culture, très exactement sur 28 jours.

TABLEAU N° 2. — *Stereum purpureum* sur milieu au nitrate de potasse.

Números des fioles	Age de la culture	Ph initial	Ph final	Poids du mycélium en gramme	Sucre consommé en gramme
1	8 jours	7	6.6	0.0005	traces
2	10	7	6.4	0.0015	0.005
3	12	7	6.6	0.001	traces
4	14	7	6.6	0.002	0.0057
5	16	7	6.6	0.0015	traces
6	18	7	6.6	0.001	0.002
7	20	7	6.6	0.0015	0.0045
8	22	7	6.6	0.0005	traces
9	24	7	6.4	0.001	0.004

TABLEAU N° 3. — *Corticium quercinum* sur milieu au nitrate de potasse.

Números des fioles	Age de la culture	Ph initial	Ph final	Poids du mycélium en gramme	Sucre consommé en gramme
1	8 jours	7	5.4	0.005	0.04
2	10	7	5.4	0.0085	0.05
3	12	7	5.4	0.008	0.045
4	14	7	5.4	0.007	0.04
5	16	7	5.4	0.0155	0.06
6	18	7	5.4	0.021	0.03
7	20	7	5.4	0.018	0.0275
8	22	7	5.2	0.008	0.045
9	24	7	5.4	0.009	0.045
10	26	7	5.4	0.027	0.045
11	28	7	5	0.007	0.05
12	30	7	5	0.005	0.04
13	32	7	5	0.032	0.06
14	34	7	5.8	0.115	totalité

On voit, d'après ces tableaux, que les Champignons considérés éprouvent beaucoup de difficulté à assimiler l'azote nitrique, puisqu'une seule culture, la dernière avec le *Corticium quercinum*, a été abondante. Les résultats obtenus sont irréguliers, mais ceci prouve que la réaction du milieu n'est pas le seul facteur influençant le développement mycélien.

Le nitrate de potasse se montre ainsi un mauvais aliment pour le *Stereum purpureum*, ce qui prouve que les résultats obtenus avec le nitrate d'ammoniaque sont bien dus à la consommation exclusive de l'ion ammoniacal. On n'obtient que des voiles très fragiles ayant tendance à se transformer en stromas.

Quant au *Corticium quercinum*, il paraît apte à assimiler l'azote nitrique comme l'azote ammoniacal. Dans les cultures sur nitrate d'ammoniaque, ces deux phénomènes se contrebalançant, la réaction du milieu varie peu.

DEUXIÈME PARTIE

ASSIMILATION DE L'AZOTE AMMONIACAL

A. — MILIEUX NON TAMPONS.

I. — *Sulfate d'ammoniaque.*

Dans un milieu renfermant l'azote sous forme de sulfate d'ammoniaque, celui-ci est complètement ionisé à l'état d'ions SO_4^- et d'ions NH_4^+ qui se font équilibre.

L'organisme ayant des besoins en azote infiniment plus élevés qu'en soufre, laissera dans la solution un excès d'ions SO_4^- qui, n'étant plus en équilibre avec les ions NH_4^+ disparus, reforment de l'acide sulfurique avec l'eau : le milieu augmente ainsi sa concentration en ions H^+ ; autrement dit, toutes les fois qu'on utilise

comme source d'azote un sel tel que $\text{SO}^4 (\text{N H}^4)^2$, on assiste à une acidification de la culture.

Notre milieu étant très peu tampon, n'oppose qu'une faible résistance à l'acidification surtout à partir de *Ph* 6 et la concentration des ions Hydrogène atteignant rapidement les valeurs dysgénésiques (*Ph* 3.6, *Ph* 3.2) devient le facteur qui limite la culture.

Le milieu de culture est le suivant :

<i>Mallose</i>	10 gr. 00
<i>Sulfate d'ammoniaque</i>	6 gr. 7 N/10
<i>Phosphate monopotassique</i>	1 gr. 36
<i>Sulfate de magnésie</i>	0 gr. 492
<i>Sulfate de manganèse</i>	0 gr. 05
<i>Eau bi-distillée Q. S. pour</i>	1.000 gr. 00

Les résultats obtenus sont les suivants (1) :

TABLEAU N° 4. — *Stereum purpureum* sur milieu sulfaté.

Fiole numéro	Age de la culture	Ph initial	Ph final	Poids du mycélium en gramme	Sucre consommé en gramme	Ammoniaque consommée en gramme
1	8 jours	7	6	0.012	0.02	0.0058
2	10	7	5.8	0.005	0.02	0.0075
3	12	7	5.2	0.013	0.015	0.0066
4	14	7	5	0.0205	0.02	0.006
5	16	7	4.4	0.0235	0.02	0.0049
6	18	7	4.8	0.031	0.024	0.0049
7	20	7	4	0.022	0.022	0.0058
8	22	7	3.8	0.029	0.051	0.0066
9	24	7	4	0.0155	0.046	0.0058
10	26	7	4	0.0145	0.04	0.0049
11	28	7	3.8	0.0165	0.053	0.0058
12	30	7	3.6	0.029	0.0562	0.0059
13	32	7	4	0.022	0.055	0.0058
14	34	7	3.8	0.021	0.0455	0.0066
15	36	7	3.8	0.019	0.0461	0.0058

(1) Les conditions de l'expérience et le numérotage des fioles étant invariables, dans la suite du travail, la disposition des tableaux précédents sera définitive.

TABEAU N° 5. — *Corticium quercinum* sur milieu sulfaté.

Fiole numéro	Age de la culture	Ph initial	Ph final	Poids du mycélium en gramme	Sucre consommé en gramme	Ammoniaque consommée en gramme
1	8 jours	7	4.6	0.018	0.01	0.00476
2	10	7	3.4	0.038	0.01	0.0077
3	12	7	3.4	0.021	0.025	0.0073
4	14	7	3.6	0.018	0.01	0.0058
5	16	7	3.8	0.014	0.01	0.0066
6	18	7	3.6	0.027	0.0265	0.0058
7	20	7	3.4	0.015	0.015	0.0041
8	22	7	3.4	0.017	0.013	0.0047
9	24	7	3.2	0.027	0.024	0.0060
10	26	7	3.2	0.027	0.024	0.006
11	28	7	3.4	0.023	0.026	0.0075
12	30	7	3.2	0.026	0.041	0.0077
13	32	7	3.4	0.0135	0.01	0.0049
14	34	7	4	0.015	0.05	0.0049

Ces tableaux montrent qu'il en est bien ainsi. L'assimilation du sulfate d'ammoniaque s'accompagne d'une acidification considérable. Le milieu passe à *Ph* 3.6 (*Stereum purpureum*) et à *Ph* 3.2 (*Corticium quercinum*) pour une formation de mycélium même très faible (2 à 3 centigrammes). La concentration en ions H est bien le facteur qui arrête la culture. La limite atteinte correspond à celle qui arrête le développement des mycéliums, et d'autre part l'addition de tampons améliore considérablement la culture.

Quand le milieu atteint le *Ph* limite, et que le développement mycélien est suspendu, l'assimilation azotée s'arrête aussi. Par contre le mycélium continuant à vivre et à respirer, semble continuer à consommer du glucose.

II. — Chlorhydrate d'ammoniaque.

Le chlorhydrate d'ammoniaque donne lieu aux mêmes observations que le sulfate. Les résultats sont exactement du même ordre.

Les deux Champignons habituels sont ensemencés sur un milieu ainsi constitué :

Maltoze	10 gr. 00	
Chlorhydrate d'ammoniaque. . . .	5 gr. 35	N/10
Phosphate monopotassique.	1 gr. 36	
Sulfate de magnésie.	0 gr. 49 ^a	
Sulfate de manganèse.	0 gr. 05	
Eau bi-distillée Q. S. pour.	1.000	gr. 00

Le *Stereum purpureum* seul a poussé. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

TABEAU N° 6. — *Stereum purpureum*. Milieu au chlorhydrate d'ammoniaque.

Flûle numéro	Age de de la culture	Ph initial	Ph final	Poids du mycélium en gramme	Sucre consommé en gramme	Ammoniaque consommée en gramme
1	8 jours	7	5	0.0215	0.019	0.0043
2	10	7	4.2	0.0205	0.018	0.0041
3	12	7	4.4	0.0175	0.015	0.0035
4	14	7	4.4	0.0175	0.016	0.0032
5	16	7	4.8	0.013	0.01	0.0030
6	18	7	4.2	0.024	0.021	0.0047
7	20	7	4.8	0.019	0.017	0.0035
8	22	7	4	0.019	0.018	0.0035
9	24	7	4.2	0.0155	0.01	0.0030
10	26	7	4.4	0.0235	0.02	0.0051
11	28	7	4	0.0185	0.016	0.0032
12	30	7	4	0.019	0.018	0.0032

B. — MILIEUX TAMPONS.

I. — *Sel à acide minéral : phosphate monoammonique.*

L'étude du phosphate d'ammoniaque est très importante. A la différence des deux corps précédemment utilisés, le phosphate d'ammoniaque stabilise fortement le milieu. On se met ainsi à l'abri des variations intenses de la concentration des ions Hydrogène qui avait été le facteur limitatif des cultures dans les deux cas précédents.

Par contre, **BACH** [37] pense que la concentration de la molécule $P O^4 H^3$ non ionisée peut devenir, quand le milieu s'acidifie, assez considérable pour exercer une action toxique propre, tout à fait indépendante de l'action des ions H. Le milieu employé est le suivant :

<i>Maltose</i>	10 gr. 00	
<i>Phosphate monoammonique</i>	11 gr. 5	(N/10)
<i>Phosphate monopotassique.</i>	1 gr. 36	
<i>Sulfate de magnésie.</i>	0 gr. 49 ²	
<i>Sulfate de manganèse.</i>	0 gr. 05	
<i>Eau bi-distillée Q. S. pour</i>	1.000 gr. 00	

Les résultats obtenus sont résumés dans les tableaux suivants :

TABLEAU N° 7. — *Stereum purpureum* sur milieu phosphaté.

Fiole numéro	Age de la culture	Ph initial	Ph final	Poids du mycélium en gramme	Sucre consommé en gramme	Ammoniaque consommée en gramme
1	8 jours	7	6.6	0.02	0.03	0.0045
2	10	7	6.6	0.0375	0.044	0.0077
3	12	7	6.8	0.0175	0.02	0.0038
4	14	7	6.8	0.0195	0.03	0.0045
5	16	7	6.8	0.0265	0.03	0.0041
6	18	7	6.6	0.0335	0.034	0.0068
7	20	7	6.6	0.023	0.03	0.0045
8	22	7	6.6	0.035	0.029	0.0068
9	24	7	6.4	0.043	0.045	0.0102
10	26	7	6.4	0.048	0.05	0.0145
11	28	7	6.6	0.044	0.047	0.0096
12	30	7	6.6	0.046	0.047	0.0145
13	32	7	6.6	0.0325	0.024	0.0068
14	34	7	6.6	0.023	0.026	0.0068

TABLEAU N° 8. — *Corticium quercinum* sur milieu phosphaté.

Fiole numéro	Age de la culture	Ph initial	Ph final	Poids du mycélium en gramme	Sucre consommé en gramme	Ammoniaque consommée en gramme
1	8 jours	7	6 4	0.031	0.03	0.0068
2	10	7	6.2	0.0445	0.038	0.0074
3	12	7	5 6	0.057	totalité	0.0155

Ces deux tableaux montrent que le *Stereum purpureum* et le *Corticium quercinum* végètent d'une façon très différente sur le milieu considéré, le *Corticium quercinum* ne s'étant développé que sur trois seulement des fiolesensemencées.

Comme on le supposait, les milieux se sont peu acidifiés. Par contre les poids de mycéliums obtenus sont importants, dans la dernière fioleensemencée avec du *Corticium quercinum* en particulier. On répétera ce qui a été dit pour le nitrate d'ammoniaque, à savoir que l'irrégularité du développement mycélien est influencée par d'autres facteurs que l'acidité.

II. — Milieu à acide gras : Acétate d'ammoniaque.

La toxicité de l'acétate d'ammoniaque pour la plupart des végétaux est bien connue.

BACH [37] a déjà montré, après beaucoup d'autres, avec l'*Aspergillus repens*, que les sels ammoniacaux d'acides gras sont toxiques pour les moisissures.

La toxicité est due aux molécules d'acides gras non ionisées, dont la concentration augmente avec l'acidité du milieu.

J'ai voulu voir si un fait du même ordre se manifeste

terait avec le *Stereum purpureum* et le *Corticium quercinum*.

J'ai ensemencé ces deux champignons sur le milieu suivant :

Mallose	20 gr. 00	
Acétate d'ammoniaque.	7 gr. 7	(N/10)
Phosphate monopotassique.	1 gr. 36	
Sulfate de magnésie.	0 gr. 492	
Sulfate de manganèse.	0 gr. 05	
Eau bi-distillée Q. S. pour	1.000 gr. 00	

réparti à la façon habituelle dans des fioles d'ERLENMEYER. Les fioles, au lieu d'être ajustées à *Ph* 7 comme pour tous les milieux précédents, ont été ajustées de façon à présenter des *Ph* étagés entre 5 et 7.

Dans ces expériences, sur les vingt fioles ensemencées par le *Corticium quercinum*, aucune n'a poussé. Avec le *Stereum purpureum*, les fioles dont les *Ph* étaient 7 et 6.8 donnent un commencement de végétation, mais la quantité de mycélium développé est trop faible pour être pesée.

L'acétate d'ammoniaque est donc un sel essentiellement toxique pour les Champignons considérés, et l'hypothèse émise se trouve vérifiée.

III. — Acide bibasique : Succinate d'ammoniaque.

De même que le phosphate monoammonique, le succinate d'ammoniaque stabilise fortement le milieu et doit s'opposer ainsi dans de certaines limites à son acidification.

Le milieu étudié est le suivant :

Mallose	10 gr. 00	
Succinate d'ammoniaque.	7 gr. 6	(N/10)
Phosphate monopotassique.	1 gr. 36	
Sulfate de magnésie.	0 gr. 492	
Sulfate de manganèse.	0 gr. 05	
Eau bi-distillée Q. S. pour	1.000 gr. 00	

Les résultats, résumés dans les tableaux suivants, montrent que le succinate d'ammoniaque constitue un

assez bon aliment. Le *Corticium quercinum* y pousse médiocrement. On obtient cependant avec ce dernier, dans la dernière fiole analysée, un poids assez important de mycélium. Par contre, le *Stereum purpureum* pousse bien ; la dernière fiole montre un développement particulièrement abondant.

TABLEAU N° 9. — *Stereum purpureum*. Milieu au succinate d'ammoniaque.

Fiole numéro	Age de la culture	Ph initial	Ph final	Poids du mycélium en gramme	Sucré consommé en gramme	Ammoniaque consommée en gramme
1	8 jours	7	6.4	0.011	0.02	0.0008
2	10	7	6.4	0.0105	0.02	0.0008
3	12	7	6	0.035	0.03	0.0034
4	14	7	6.8	0.0055	0.016	0.0007
5	16	7	6.8	0.009	0.019	0.0008
6	18	7	6.4	0.015	0.02	0.0008
7	20	7	6.4	0.018	0.02	0.0017
8	22	7	6.6	0.01	0.019	0.0008
9	24	7	6.2	0.0305	0.029	0.0034
10	26	7	6.4	0.016	0.02	0.0013
11	28	7	6.4	0.0185	0.025	0.0015
12	30	7	6.2	0.028	0.027	0.0030
13	32	7	6.4	0.016	0.02	0.0013
14	34	7	6.2	0.0215	0.032	0.0035
15	36	7	5.8	0.1105	totalité	0.0238

TABLEAU N° 10. — *Corticium quercinum*. Milieu au succinate d'ammoniaque.

Fiole numéro	Age de la culture	Ph initial	Ph final	Poids du mycélium en gramme	Sucré consommé en gramme	Ammoniaque consommée en gramme
1	8 jours	7	5.6	0.0115	0.015	0.008
2	10	7	5.6	0.02	0.02	0.0034
3	12	7	5.6	0.0125	0.019	0.0019
4	14	7	5.8	0.0135	0.02	0.0026
5	16	7	5.4	0.0795	0.088	0.0026

Ces expériences vérifient les résultats prévus.

IV. — *Acide-alcool*: *Tartrate d'ammoniaque*.

Ce sel a été choisi comme type de sel d'acide-alcool.

Les cultures ont été faites sur le milieu ainsi constitué :

<i>Mallose</i>	10 gr. 00	
<i>Tartrate neutre d'ammoniaque</i> . . .	9 gr. 20	(N/10)
<i>Phosphate monopotassique</i>	1 gr. 36	
<i>Sulfate de magnésie</i>	0 gr. 492	
<i>Sulfate de manganèse</i>	0 gr. 05	
<i>Eau bi-distillée Q. S. pour</i>	1.000 gr. 00	

On verra par les tableaux suivants que le tartrate d'ammoniaque constitue pour les Champignons considérés un assez bon milieu, meilleur que le succinate. Les cultures sont plus égales et plus riches.

Par suite de l'excès de sucre mis à sa disposition, le Champignon ne paraît pas s'attaquer à l'acide tartrique. Le milieu, au lieu de s'alcaliniser, reste dans une zone de *Ph* légèrement acide, favorable au développement du mycélium.

TABLEAU N° 11. — *Stereum purpureum* sur milieu au tartrate d'ammoniaque.

Fiole numéro	Age de la culture	Ph initial	Ph final	Poids du mycélium en gramme	Sucre consommé en gramme	Ammoniaque consommée en gramme
1	8 jours	7	6.8	0.004	0.01	0.0043
2	10	7	6.6	0.012	0.025	0.006
3	12	7	6.6	0.006	0.015	0.0051
4	14	7	6.4	0.016	0.025	0.0051
5	16	7	6.4	0.004	0.015	0.005
6	18	7	6	0.015	0.025	0.0065
7	20	7	5.8	0.0195	0.025	0.007
8	22	7	5.8	0.02	0.025	0.0077
9	24	7	5.4	0.0022	0.025	0.0079
10	26	7	5.6	0.0195	0.025	0.0068
11	28	7	5.6	0.024	0.025	0.0068
12	30	7	5.4	0.0285	0.029	0.0085
13	32	7	5.4	0.02	0.025	0.0068
14	34	7	5	0.0575	0.10	0.009

TABLEAU N° 12. — *Corlicium quercinum* sur milieu au tartrate d'ammoniaque.

Flûle numéro	Age de la culture	Ph initial	Ph final	Poids du mycélium en gramme	Sucre consommé en gramme	Ammoniaque consommée en gramme
1	8 jours	7	5.8	0.0065	0.01	0.00458
2	10	7	5.8	0.024	0.025	0.0052
3	12	7	5.6	0.0155	0.015	0.0049
4	14	7	5.4	0.012	0.015	0.0054
5	16	7	5.2	0.0355	0.025	0.0067
6	18	7	5.2	0.02	0.025	0.0061
7	20	7	5.2	0.042	0.025	0.0075
8	22	7	5.4	0.02	0.015	0.006
9	24	7	5.4	0.0165	0.015	0.0055
10	26	7	5.4	0.014	0.015	0.0054
11	28	7	5.4	0.0105	0.015	0.0050
12	30	7	5.2	0.0385	0.042	0.0090
13	32	7	5.4	0.012	0.01	0.0055
14	34	7	5.2	0.0935	0.093	0.0092

ASSIMILATION DE L'URÉE

La valeur alimentaire de l'urée comme source d'azote pour les moisissures est connue depuis longtemps. **BRENNER** [45] (1914) a résumé les travaux sur ce sujet. Les différents auteurs la considèrent, en général, comme un bon aliment. **BACH** [37] la considère d'une valeur moyenne pour l'*Aspergillus repens*.

Il était intéressant de vérifier la valeur de ces observations, à l'aide des organismes étudiés jusqu'ici. Je les ai ensemencés sur un milieu à l'urée ainsi constitué :

Maltose	10 gr. 00	
Urée	3 gr. 00	(N/10)
Phosphate monopotassique.	1 gr. 36	
Sulfate de magnésie.	0 gr. 492	
Sulfate de manganèse.	0 gr. 05	
Eau bi-distillée Q. S. pour	1.000 gr. 00	

Les conditions de l'alimentation sucrée étant les mêmes dans ce milieu que dans les milieux précédents, et cette assimilation ayant déjà été suivie dans toutes les expériences, je me suis bornée, dans ce dernier cas, à rechercher les poids de mycélium obtenus et la variation de l'acidité.

TABLEAU N° 13. — *Stereum purpureum* sur milieu à l'urée.

Fiole numéro	Age de la culture	Ph initial	Ph final	Poids du mycélium en gramme
1	8 jours	7	8.6	0.01
2	10	7	8.8	0.016
3	12	7	8.6	0.0225
4	14	7	8.6	0.0185
5	16	7	8.8	0.008
6	18	7	8.6	0.009
8	20	7	8.6	0.016
7	22	7	8.6	0.0145

TABLEAU N° 14. — *Corticium quercinum* sur milieu à l'urée.

Fiole numéro	Age de la culture	Ph initial	Ph final	Poids du mycélium en gramme
1	8 jours	7	5.8	0.0165
2	10	7	4.8	0.0225
3	12	7	5.6	0.0295
4	14	7	5.4	0.0235
5	16	7	5.8	0.022
6	18	7	5.8	0.023
7	20	7	6	0.022
8	22	7	5.8	0.025

L'observation de ces tableaux montre tout d'abord que

l'urée donne des résultats plutôt inférieurs à ceux fournis par les composés ammoniacaux. Sur vingt fioles ensemencées avec chacun des Champignons, huit seulement ont poussé, et les poids de mycélium obtenus sont faibles.

L'allure du développement du *Corticium quercinum* ne présente aucune particularité. Par contre le *Stereum purpureum* alcalinise nettement le milieu, ce qui démontre la sécrétion d'une uréase par ce Champignon et la transformation concomitante de l'urée en carbonate d'ammoniaque.

Les deux tableaux précédents montrent que les résultats obtenus avec ce milieu de culture, que l'expérience a démontré médiocrement favorable, sont cependant plus uniformes que ceux fournis par les milieux précédemment étudiés. Or ce milieu réparti à l'aide de l'appareil de **BACH** [40] n'avait pas été stérilisé à l'autoclave. Ceci laisse supposer l'infériorité des milieux stérilisés lorsqu'il s'agit de substances altérables à haute température. Peut-être y a-t-il, dans ce dernier cas, altération par la chaleur d'un des éléments du milieu sucré, ou dissolution de substances toxiques appartenant au verre.

COMPARAISON DU XYLOSE ET DU MALTOSE COMME ALIMENTS CARBONÉS

Le milieu au tartrate d'ammoniaque s'étant montré particulièrement favorable à la culture du *Stereum purpureum* et du *Corticium quercinum*, j'ai essayé de déterminer l'influence exercée sur le rendement par la substitution à la moitié du maltose d'une égale quantité de xylose. J'ai ainsi préparé le milieu suivant :

<i>Maltose</i>	5 gr. 00	
<i>Xylose</i>	5 gr. 00	
<i>Tartrate neutre d'ammoniaque</i> . . .	9 gr. 20	(N/10)
<i>Phosphate monopotassique</i>	1 gr. 36	
<i>Sulfate de magnésie</i>	0 gr. 49 ²	
<i>Sulfate de manganèse</i>	0 gr. 05	
<i>Eau bi-distillée Q. S. pour</i>	1 000 gr. 00	

J'ai ensemencé les organismes précédents à la façon habituelle. Je me suis bornée dans ce cas à déterminer l'ammoniaque consommée, la variation de l'acidité et les poids de mycélium obtenus.

On verra, dans les tableaux suivants, que l'allure de la culture est sensiblement la même qu'avec le milieu maltosé. Le développement du mycélium est cependant plus prompt, plus égal, et les poids obtenus sont plus voisins les uns des autres.

Stereum purpureum sur milieu xylosé-maltosé

Flûle numéro	Age de la culture	Ph initial	Ph final	Poids du mycélium en gramme	Ammoniaque consommée en gramme
1	8 jours	7	6.6	0.011	0.006
2	10	7	6.4	0.003	0.0042
3	12	7	6.2	0.005	0.0045
4	14	7	5.8	0.0195	0.0077
5	16	7	6	0.01	0.0051
6	18	7	5.8	0.016	0.0051
7	20	7	5.8	0.0105	0.006
8	22	7	5.8	0.017	0.0068
9	24	7	5.4	0.02	0.0080
10	26	7	5.2	0.0295	0.0086
11	28	7	5.2	0.0285	0.0084
12	30	7	5.2	0.0265	0.0084

Stereum purpureum sur milieu maltosé (1).

Flûle numéro	Age de la culture	Ph initial	Ph final	Poids du mycélium en gramme	Ammoniaque consommée en gramme
1	8 jours	7	6.8	0.004	0.0043
2	10	7	6.6	0.012	0.006
3	12	7	6.6	0.006	0.0051
4	14	7	6.4	0.016	0.0051
5	16	7	6.4	0.004	0.005
6	18	7	6	0.015	0.0065
7	20	7	5.8	0.0195	0.007
8	22	7	5.8	0.02	0.0077
9	24	7	5.4	0.022	0.0079
10	26	7	5.6	0.0195	0.0068
11	28	7	5.6	0.024	0.0068
12	30	7	5.4	0.0285	0.0085

(1) Ce tableau est le rappel de celui du tartrate d'ammoniaque maltosé précédemment étudié. Son rapprochement du tableau au xylose-maltose montre la similitude des deux expériences.

Corticium quercinum sur milieu xylosé-maltosé.

Fiole numéro	Age de la culture	Ph initial	Ph final	Poids du mycélium en gramme	Ammoniaque consommée en gramme
1	8 jours	7	5.2	0.0085	0.0047
2	10	7	5.2	0.022	0.0051
3	12	7	5.2	0.0185	0.0050
4	14	7	5.2	0.0085	0.0045
5	16	7	4.8	0.0365	0.0077
6	18	7	4.8	0.006	0.0045
7	20	7	4.8	0.015	0.050
8	22	7	5.2	0.037	0.0077
9	24	7	4.8	0.056	0.0098
10	26	7	4.8	0.018	0.0051
11	28	7	4.4	0.075	0.0145
12	30	7	4.8	0.043	0.009

Corticium quercinum sur milieu maltosé (1).

Fiole numéro	Age de la culture	Ph initial	Ph final	Poids du mycélium en gramme	Ammoniaque consommée en gramme
1	8 jours	7	5.8	0.0065	0.00458
2	10	7	5.8	0.024	0.0052
3	12	7	5.6	0.0155	0.0049
4	14	7	5.4	0.012	0.0054
5	16	7	5.2	0.0355	0.0067
6	18	7	5.2	0.02	0.0061
7	20	7	5.2	0.042	0.0075
8	22	7	5.4	0.02	0.0060
9	24	7	5.4	0.0165	0.0055
10	26	7	5.4	0.014	0.0054
11	28	7	5.4	0.0105	0.0050
12	30	7	5.2	0.0385	0.0090

(1) Voir note du tableau précédent.

CONCLUSIONS

Les résultats exposés dans ce travail montrent l'extraordinaire difficulté de la culture des *Champignons* en milieu chimiquement défini.

Les divergences inattendues obtenues parfois dans les résultats ne peuvent s'expliquer par le mode d'ensemencement. Le bloc de Hêtre utilisé comme support, grâce aux délavages successifs auxquels il a été soumis, apporte encore sa cellulose comme source alimentaire; mais le poids de mycélium formé dans ces conditions est extrêmement faible, et négligeable par rapport au poids obtenu après culture sur milieu artificiel.

Les irrégularités observées dans une même série d'expériences s'expliquent plutôt par l'emploi des substrats liquides, indispensable à l'application de la méthode.

Sous réserve de cette observation, voici les conclusions que l'on peut tirer de notre travail :

1° *L'azote ammoniacal* paraît assimilable par ces organismes, mais les phénomènes secondaires qui accompagnent l'assimilation de l'ammoniaque jouent un rôle souvent prépondérant :

a) *Avec les sels ammoniacaux d'acides forts*, l'acidification qui résulte de l'absorption de l'ammoniaque amène une acidification rapide des milieux, et la concentration en ions Hydrogène qui est atteinte devient le facteur limitant la culture ($\text{N H}^+\text{Cl}$; $\text{SO}_4(\text{N H}^+)_2$) ;

b) *Avec les sels ammoniacaux d'acides faibles* (phosphates, sels organiques), le milieu acquiert des propriétés

tampons qui empêchent cette acidification. Le *Ph* ne baisse pas au-dessous de 5.

L'arrêt de la culture est ici dû à d'autres causes que la concentration en ions Hydrogène ;

c) Avec les sels d'acides gras, les cultures sont constamment négatives, à cause de la toxicité des molécules d'acides gras, non ionisées ;

2° L'azote nitrique ne paraît assimilable que par le *Corticium quercinum*. Les résultats fournis par le nitrate d'ammoniaque doivent être interprétés à la lumière de ces faits.

Avec le *Stereum purpureum*, le nitrate d'ammoniaque se comporte comme le sulfate ou le chlorhydrate, sels où l'anion est inassimilable.

Avec le *Corticium quercinum*, l'assimilation simultanée de l'anion et du cation empêche les variations étendues de la concentration en ions Hydrogène ;

3° L'urée est un aliment médiocre. L'alcalinisation du milieu, produite dans ce cas seulement par le *Stereum purpureum*, démontre nettement la présence d'une uréase dans ce Champignon ;

4° La présence de xylose favorise la culture et la rend beaucoup plus régulière.

Vu :

Bon à imprimer
Le Président de la thèse,
RADAIS

Vu :

Le Doyen de la Faculté,
RADAIS

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
S. CHARLÉTY

